

# 几种香料植物提取物对大肠杆菌抑制作用的试验

李利红<sup>1</sup>, 陈忠杰<sup>1</sup>, 卢婷婷<sup>1</sup>, 解克伟<sup>2</sup>

(1. 郑州牧业工程高等专科学校药物工程系, 河南 郑州 450011; 2. 禹州森源本草天然产物有限公司, 河南 禹州 461683)

**摘要:**对3种香料植物的5种提取物抑制大肠杆菌的作用效果进行比较研究,为兽医临床合理使用中药提取物防治大肠杆菌提供实验依据。提取丁香油、茴香油、迷迭香油、迷迭香酸和鼠尾草酸,经HPLC测定迷迭香酸和鼠尾草酸的含量,用打孔法研究以上物质对标准型大肠杆菌和临床型大肠杆菌的体外抑菌作用。结果显示,几种提取物均有抑菌活性,对标准型大肠杆菌的抑菌效果依次为:丁香油>鼠尾草酸>迷迭香油>迷迭香酸>八角茴香油,最大抑菌圈达20 mm;对临床型大肠杆菌的抑菌效果依次为:鼠尾草酸>迷迭香酸>八角茴香油>迷迭香油>丁香油,最大抑菌圈达19 mm。表明丁香油、八角茴香油、迷迭香油、迷迭香酸和鼠尾草酸有较强的抑制大肠杆菌的活性,可以作为抗大肠杆菌药物进行进一步研究。

**关键词:**大肠杆菌;抑制作用;迷迭香酸;鼠尾草酸;丁香油;迷迭香油;八角茴香油

中图分类号:R378.2<sup>+</sup>1 文献标识码:B 文章编号:0529-6005(2013)06-0054-02

致病性大肠杆菌病是现代规模化、集约化畜禽养殖的主要传染病之一,目前尚无理想的疫苗来预防,临床主要采用抗菌药物治疗。近年来,由于抗菌药物的持续和不恰当地使用,大肠杆菌耐药机制不断变迁,耐药性不断提高<sup>[1-3]</sup>,导致抗菌药物的疗效降低甚至失去疗效;大肠杆菌耐药现象已经成为现代畜牧业健康养殖的限制性瓶颈,而抗菌药物不规范使用所带来的的环境卫生和食品安全问题也已越来越受世人关注,因此如何选用对大肠杆菌有较好抑制作用的药物是当今兽医临床的主要任务之一。中草药具有来源广、副作用小、不易产生耐药性等特点,已经成为现代预防和控制细菌性感染疾病方面

的重要研究对象<sup>[4-5]</sup>。近年来关于中药芳香性物质的抗微生物活性报道很多<sup>[6-8]</sup>,但是关于其对大肠杆菌抑制效果的研究报道不多,因此,本试验选取丁香、八角茴香和迷迭香3种香料植物,提取其中的5种主要成分,在体外研究其对大肠杆菌的抑制作用,期望为兽医临床合理使用中草药提取物防治大肠杆菌病提供理论和试验依据,为研究和开发抗菌中药解决耐药菌株的产生和抗生素短缺问题提供途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

1.1.1 试验材料 迷迭香采自河南禹州森源本草天然产物有限公司种植基地,其他药材购自郑州零售药店。

所用菌株分别为:大肠杆菌(标准型);大肠杆菌(临床致病型,从犊牛稀粪便中分离)。菌株由郑州牧业工程高等专科学校药物工程系实验室提供。

收稿日期:2013-04-02

基金项目:河南省科技发展计划(122102110130);郑州牧业工程高等专科学校科技创新团队项目

作者简介:李利红(1972-),女,副教授,博士,主要从事药用植物的开发和利用研究,E-mail:zzmzllh@163.com

免受病原侵袭,提示鸭脚树叶提取物与青霉素混合物用于治疗缓慢葡萄球菌病可获良好效果,鸭脚树叶提取物与青霉素中西合剂中各组分没有明显相互拮抗作用,显示鸭脚树叶提取物与青霉素混合物对防治 *S. lentus* 病具有良好的应用前景。

细菌引起的疾病是养殖业一大危害,而抗生素的长期滥用导致耐药菌株的种类越来越多,因此,急需研制既可有效防治细菌病、药理作用机制明确,又能替代抗生素的新型中药制剂。以中药材中活性成分作为配伍对象,将药物配伍改为组分配伍制成的鸭脚树叶提取物与青霉素中西合剂,其高、中、低剂量组降低死亡率的效果与感染对照组比较差异均极显著( $P < 0.01$ ),一定程度印证了中药配伍理论和中药组分子的科学性,为临床筛选治疗缓慢葡萄球菌病药物制剂提供试验依据,但对于 *S. lentus* 的致

病机理以及鸭脚树叶提取物与青霉素混合物的作用机制还需进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Kloos W E, Schleifer K H, Smith R F. Characterization of *Staphylococcus sciuri* sp nov and its subspecies[J]. Int J Syst Bacteriol, 1976, 26: 22-37.
- [2] Schleifer K H, Geyer U, Kilpper-Balz R, et al. Elevation of *Staphylococcus sciuri* subsp. *lentus* (Kloos, et al.) to species status: *Staphylococcus lentus* (Kloos, et al.) comb Nov [J]. Syst Appl Microbiol, 1983, 4: 382-387.
- [3] 盛相鹏, 杜崇涛, 许会会, 等. 仓鼠源缓慢葡萄球菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 动物医学进展, 2010, 31(7): 30-35.
- [4] 冯翠兰, 潘带卿, 刘媛姬. 从鸭脚树叶中提取熊果酸的初步研究[J]. 科技创新导报, 2011, 32: 4-5.
- [5] 刘富来, 冯翠兰. 猪源缓慢葡萄球菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 中国动物检疫, 2011(4): 56-58.

1.1.2 主要仪器与试剂 CTXNW-2B循环超声萃取仪(北京弘祥隆生物技术开发有限公司);R-1001-VN旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司);RE-5210旋转蒸发仪(上海亚荣);LXJ-IIB离心机(上海安亭科学仪器厂);P230II高效液相色谱仪(上海依利特);BT125D十万分之一分析天平(赛多利斯),阿贝折射仪(上海宇隆2W)。

鼠尾草酸和迷迭香酸标准品,均由禹州森源本草天然产物有限公司提供;重蒸水,甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 精油的提取制备 称取丁香、八角茴香和迷迭香药材各500g,用水蒸气蒸馏法提取各自的挥发油,20℃以下测定相对密度和折光率。

1.2.2 迷迭香酸和鼠尾草酸的提取制备 称取提取过精油的迷迭香残渣200g,用40倍体积的90%乙醇进行回流提取1h(加少许柠檬酸),将提取液进行过滤,滤液和残渣分别用来提取鼠尾草酸和迷迭香酸。滤液进行减压浓缩至1/5体积,4000 r/min离心,保留沉淀物,进行真空干燥,称重,用HPLC测定鼠尾草酸含量。残渣加50倍体积的水进行超声提取30min,过滤,对滤液进行减压浓缩和真空干燥,称重,用HPLC测定迷迭香酸含量。

1.2.3 迷迭香酸和鼠尾草酸含量的测定 (1)鼠尾草酸标准品溶液的配制:精密称取105℃干燥4h后至质量恒定的鼠尾草酸标准品10.0mg,置于10mL棕色容量瓶中,用无水乙醇溶解并稀释至刻度定容,摇匀,其质量浓度为1mg/mL作为标准溶液;(2)迷迭香酸标准品溶液的配制:精密称取80℃下干燥至恒重的迷迭香酸标准品10.0mg溶于10mL甲醇溶解并稀释至刻度定容,得1mg/mL迷迭香酸标准溶液;(3)鼠尾草酸样品测定:称取鼠尾草酸提取物100mg,无水乙醇定溶至50mL,微孔滤膜过滤,超声脱气,HPLC测定。采用C18柱,流动相为乙腈:0.1%磷酸=60:40,流速为1mL/min,230nm测定;(4)迷迭香酸样品测定:称取迷迭香酸提取物100mg,甲醇定溶至50mL,微孔滤膜过滤,超声脱气,HPLC测定。采用C18柱,流动相为甲醇:0.05%磷酸=45:50,流速为0.6mL/min,283nm

测定。均做平行试验3次,以峰面积按外标法进行定量计算。

1.2.4 菌种的复壮与扩增 参照文献[9]进行大肠杆菌的复壮和扩增,用于营养琼脂平板涂菌。

1.2.5 涂菌 取制备好的营养琼脂平板培养基,分别加入100μL制备好的10<sup>5</sup>CFU/mL菌液,用涂菌玻璃棒涂均匀。

1.2.6 打孔 用直径为6.5mm的打孔器在涂菌的琼脂培养基上均匀打孔,并编号,每种药重复两个平皿,每个平皿做3个孔。孔径大小、深度保持均匀一致。打好孔后在酒精灯火焰上略微加热,使局部培养基熔化重新凝固与平皿底部结合,防止加入的药物从底部的缝隙流出。

1.2.7 加药 将迷迭香酸和鼠尾草酸配制成含有效成分1mg/mL的水溶液,挥发油直接添加,分别加入各孔中,每孔加20μL药液,置于恒温箱中37℃条件下,培养24h。取出,量取抑菌圈直径。每孔在不同方向测量2次,取平均值。

1.2.8 抑菌结果判定 抑菌效果判定,抑菌直径>20mm为极敏感,用“++++”表示;15~19mm为高敏感,用“+++”表示;10~14mm为中敏感,用“++”表示;10mm以下为低敏感,用“+”表示;“-”表示无抑菌作用。

2 结果与分析

2.1 提取结果 迷迭香经蒸馏、脱水后得到无色透明迷迭香油,提取率为1.5%(平均每100g原料得到1.5mL精油),相对密度为0.869,折光率为1.466。丁香花蕾经蒸馏、脱水后得到无色透明丁香油,提取率为9.5%(平均每100g原料得到9.5mL精油),相对密度为1.041,折光率为1.532。八角茴香经蒸馏、脱水后得到无色透明八角茴香油,提取率为5.3%(平均每100g原料得到5.3mL精油),相对密度为0.982,折光率为1.555。鼠尾草酸的提取率为7%;迷迭香酸的提取率为4%。

2.2 迷迭香酸和鼠尾草酸含量测定结果 230nm下,经HPLC测定,鼠尾草酸的纯度为16.24%;迷迭香酸的纯度为5.37%。

2.3 药物敏感性测定结果 几种提取物的抑菌圈测定结果见表1所示。

表1 抑菌圈测定

供试菌种	抑菌圈直径(D/mm)				
	鼠尾草酸	迷迭香酸	迷迭香油	丁香油	八角茴香油
大肠杆菌(标准型)	13±0.11 <sup>++</sup>	10±0.13 <sup>++</sup>	13±0.09 <sup>++</sup>	20±0.12 <sup>++++</sup>	9±0.17 <sup>+</sup>
临床致病性大肠杆菌 (从犊牛稀便粪中分离)	19±0.08 <sup>+++</sup>	15±0.17 <sup>+++</sup>	9±0.16 <sup>+</sup>	7±0.12 <sup>+</sup>	10±0.21 <sup>++</sup>

++++:抑菌圈直径>20mm; +++:抑菌圈直径在15~19mm; ++:抑菌圈直径在10~14mm; +:抑菌圈直径在10mm以下; -:无抑菌作用

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒 Nsp2 研究进展

闫军霞<sup>1</sup>, 毕孝瑞<sup>2</sup>

(1. 汕尾出入境检验检疫局, 广东 汕尾 516600; 2. 鲅鱼圈出入境检验检疫局, 辽宁 营口 115007)

中图分类号: S814

文献标识码: A

文章编号: 0529-6005(2013)06-0056-02

猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)是目前世界上对养猪业带来重大经济损失的一种传染性疾病, PRRSV是该病病原, 一种具有包膜的单股正链 RNA 病毒, ORF1a, ORF1b 编码该病毒非结构蛋白(Nsps)其编码的 ORF1a, ORF1ab 两个具有病毒的复制酶和 RNA 聚合酶功能的多聚蛋白 ppla 和 pplb 在蛋白水解酶裂解作用下产生至少 12 个推测的非结构蛋白 Nsp1~Nsp12<sup>[1]</sup>。Nsp2 作为 PRRSV 最大的非结构蛋白, 具有高变异特性及多种生物学特性且应用广泛, 在病毒研究中, Nsp2 一直是研究热点, 本文就 PRRSV

的非结构蛋白 Nsp2 分子生物学特性、免疫学功能及其应用做一简要综述。

## 1 非结构蛋白 Nsp2 的生物学特性

在所有的非结构蛋白中, Nsp2 是 PRRSV 中最大的复制相关蛋白, 目前已鉴定 Nsp2 四个主要功能区: N-端的半胱氨酸蛋白酶结构域(PL2); 功能尚未清楚的中间高变区; 近 C 端的高亲水性转膜区; 功能尚不明确的 C 端富含半胱氨酸残基保守区。PRRSV 非结构蛋白 Nsp2 半胱氨酸蛋白酶结构域(Cp), 介导 Nsp2/Nsp3 切割, 还是 Nsp4 丝氨酸蛋白酶的辅助因子, C 端与 Nsp3 之间的非共价结合作为多蛋白病毒复制复合体装配的膜锚定器支持双膜囊泡(DMV)的形成, Nsp2 通过 PL2 区介导自身从前体蛋白上解离<sup>[2-3]</sup>, 相关研究表明, Nsp2 在感染

收稿日期: 2012-07-09

作者简介: 闫军霞(1984-), 女, 硕士, 助理兽医师, 主要从事出入境检验检疫工作, E-mail: xraiaijx@163.com

由表 1 可见, 鼠尾草酸和迷迭香酸都对致病性大肠杆菌表现高度敏感, 对标准型大肠杆菌表现中度敏感; 迷迭香油和丁香油对标准型大肠杆菌的抑制作用均明显大于对致病性大肠杆菌的抑制作用; 八角茴香油对两种大肠杆菌的抑制作用相差不明显。几种提取物对标准型大肠杆菌的抑菌效果依次为: 丁香油>鼠尾草酸>迷迭香油>迷迭香酸>八角茴香油, 最大抑菌圈达 20 mm; 对临床型大肠杆菌的抑菌效果依次为: 鼠尾草酸>迷迭香酸>八角茴香油>迷迭香油>丁香油, 最大抑菌圈达 19 mm。

## 3 讨论

3.1 本试验用现代中药提取、分析技术, 对几种中药提取物抑制大肠杆菌的作用进行了体外试验, 具有工艺稳定、有效成分含量明确、质量可控的特点; 本试验表明, 迷迭香酸、鼠尾草酸、迷迭香油、丁香油和八角茴香油均有较强的体外抑制大肠杆菌作用。

3.2 由于中药成分复杂, 抗感染疗效主要以增加机体免疫力为途径, 因此目前中药抑菌作用的研究方面还存在试验操作缺乏统一标准、体内体外试验结果不一致和作用机制探讨不深等问题<sup>[10-12]</sup>。今后应进一步借助现代先进的工艺和分析方法, 加强对中药抗感染药物的正确认识, 深入探讨中药作为抗感染治疗和消除细菌耐药性的作用途径和作用效果。

## 参考文献:

- [1] 舒蕾, 万莉, 张琦, 等. 四川某些规模化猪场大肠杆菌的分离鉴定及耐药性监测[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(3): 32-34.
- [2] 赵阳, 王艺萌, 张文龙, 等. 黑龙江省部分地区鹅致病性大肠杆菌血清型鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(11): 20-22.
- [3] 夏利宁, 赵红琼, 苏艳, 等. 新疆某猪场分离的大肠杆菌对抗生素耐药性调查[J]. 新疆农业科学, 2013(12): 2299-2303.
- [4] 孙喆, 刘树铭. 20 种中草药对多重耐药大肠杆菌的体外抑菌作用[J]. 吉林畜牧兽医, 2009, 30(11): 6-8.
- [5] 李淑红, 王京仁, 成钢, 等. 28 种中草药对猪大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 广东农业科学, 2012(22): 131-133.
- [6] 吴慧清, 吴清平, 石立三, 等. 植物精油对微生物的抑菌效果评估研究[J]. 食品科学, 2008(12): 83-86.
- [7] 董艳芳, 叶睿超, 郭彩霞, 等. 垂枝香柏挥发油的化学成分与抑菌活性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(3): 1-5.
- [8] 王健, 黄慧, 王喆之, 等. 七叶鬼灯藜挥发油及不同提取物抑菌活性研究[J]. 食品工业科技, 2012: 74-76.
- [9] 张雪梅, 熊焕章, 李晶. 仔猪大肠杆菌的分离鉴定及中药抑菌试验[J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(1): 33-34.
- [10] 邱妍, 王志蕊, 李雯静, 等. 几种常见中药对大肠杆菌的体内体外抑菌效果[J]. 畜牧兽医科技信息, 2012(10): 29-31.
- [11] 薛建江, 乔海霞, 刘进军, 等. 6 种常用抗菌中药对 3 株常见病原性细菌的抑菌作用检测[J]. 河北北方学院学报(医学版), 2008, 3: 19-21.
- [12] 张涛, 张爽, 胡格, 等. 盐酸小檗碱、绿原酸和黄芩苷对大肠杆菌的体外抑菌作用[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(1): 42-43.